

اثر هیپرترمی بر ناهنجاریهای کروموزومی ناشی از تابش نوترون در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان

داریوش فاتحی *

چکیده:

در تحقیق حاضر اثر هیپرترمی بر آسیب‌های کروموزومی ناشی از تابش نوترون در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان با روش آنالیز کروموزومهای متافازی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های خون به طور جداگانه تحت تأثیر هیپرترمی (در 41.5°C و 43°C)، تابش 10 cGy نوترون و همچنین تحت تأثیر توأم آنها قرار گرفتند. پس از انجام مراحل کشت کروموزومی، تهیه گسترش و رنگ آمیزی، انواع ناهنجاریهای کروموزومی شمارش و ثبت گردید. بررسی‌های آماری نشان داد که هیپرترمی 41.5°C باعث ایجاد ناهنجاریهای کروموزومی نمی‌شود اما در 43°C این آسیب‌ها مشاهده شدند ($P < 0.05$). با تابش دوز پایین نوترون (10 cGy) هم این آسیب‌ها ایجاد شدند. در بررسی اثر توأم هیپرترمی و نوترون مشاهده شد که هیپرترمی پس از تابش باعث افزایش آسیب‌ها می‌شود که علت آن اثر هیپرترمی در مهار روند ترمیم آسیب‌های DNA ناشی از نوترون می‌باشد. مشاهدات نشان می‌دهد که ترکیب هیپرترمی و دوزهای کم نوترون می‌تواند روش مناسبی برای درمان تومورها باشد.

واژه‌های کلیدی: نوترون، هیپرترمی، ناهنجاریهای کروموزومی

مقدمه:

باعث بهتر شدن نتیجه درمان خواهد شد (۲). از آنجا که در مورد اثرات ترکیب هیپرترمی با اشعه X و γ بطور گسترده‌ای کار شده است اما در مورد نوترون بویژه تیمار سلولی با هیپرترمی کار زیادی انجام نشده و با توجه به تحقیقات زیادی که در زمینه ایجاد مقاومت انجام می‌شود، این مطالعه در راستای پیشبرد اهداف مذکور ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر با توجه به نتایج ضد و نقیضی که وجود دارد تحقیقات بیشتری را در این زمینه می‌طلبد.

مشکل سلولهای هیپوکسیک و مقاومت نسبی آنها در برابر پرتوهای X و γ در درمان تومورها همواره مورد توجه رادیوتراپیست‌ها بوده است. از آنجا که این سلولها کلونوزیک بوده و در شرایط مناسب می‌توانند رشد و تکثیر داشته باشند، بقای تعداد کمی از آنها در پایان رادیوتراپی سبب عود مجدد تومور می‌شود. به نظر می‌رسد استفاده از پرتوهای نوترونی (با L.E.T بالا، O.E.R نسبتاً کم و وابستگی خیلی کم به فازهای مختلف سیکل سلولی) و هیپرترمی (بعنوان یک روش الحاقی)

* عضو هیأت علمی گروه فیزیک - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

مواد و روشها:

در این مطالعه برای انجام آزمایش، نمونه‌های خون از افراد مذکر سالم، ۲۵-۳۰ ساله و غیرسیگاری که هیچگونه پرتوگیری قبلی نداشته‌اند تهیه شد. پس از تهیه خون هپارینه (۵۰۰۰ واحد در میلی لیتر) حدود ۳ ml از آن داخل شیشه‌های استریل ریخته شد، سپس نمونه‌ها تحت تابش نوترون قرار گرفتند. برای انجام تابش نوترون از منبع کالیفرنیوم (^{252}Cf) موجود در آزمایشگاه تحقیقات دوزیمتری نوترون و ذرات باردار سازمان انرژی اتمی ایران استفاده شد. قسمت اعظم نوترونهای این چشمه بین انرژی‌های ۱-۶ MeV قرار دارند که جزء نوترونهای سریع محسوب می‌شوند. تندی دوز نوترون مورد استفاده ۱/۵۲ cGy/hr و شعاع تابش ۳/۵ cm بود.

یک ساعت پس از اتمام تابش، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $41/5^{\circ}\text{C}$ و یا ۳۰ دقیقه در دمای 43°C درون انکوباتور قرار داده شدند. برای اعمال هیپرترمی از انکوباتور ساخت شرکت شیمی فن استفاده شد و درجه حرارت‌ها هر پنج دقیقه بوسیله یک دماسنج کالیبره با دقت $\pm 0/1^{\circ}\text{C}$ کنترل شد. بلافاصله بعد از اتمام هیپرترمی، نمونه‌ها را به انکوباتور 37°C منتقل کرده و به مدت ۳۰ دقیقه درون آن نگهداری شدند. پس از آن برای تهیه کشت کروموزومی ۵/۰ ml از این نمونه‌های خون درون ۴ ml محیط کشت RPMI-1640 (ساخت شرکت بهار افشان) ریخته شد و به آن ۱ ml سرم جنینی گوساله (Gibco) اضافه شد. سپس مخلوطی از (واحد) ۱۰۰ پنی سیلین و (μg) ۱۰۰ استرپتومایسین به محیط افزوده شد. برای تحریک سلولها ۲/۰ ml از عامل میتوزن PHA (بهار افشان) به مخلوط حاضر اضافه شد. شیشه‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور 37°C نگهداری شدند و سپس با افزودن KCl (با غلظت $0/075 \frac{\text{mol}}{\text{lit}}$) به سلولها شوک هیپوتونیک وارد کرده و با استفاده از محلول فیکساتیو تازه

(شامل سه حجم الکل متانول و یک حجم اسید استیک خالص) سلولها شستشو داده شدند. پس از انجام این مرحله، چند قطره از محلول باقیمانده روی لامهای سرد پرتاب شد و لامها به مدت ۲۰ دقیقه درون رنگ گیمسای ۵٪ قرار داده شدند (۷،۶). ناهنجاریهای کروموزومی با استفاده از میکروسکوپ ZIESS در ۱۰۰ متافاز برای هر نمونه بررسی و شمارش شدند. تعداد متافاز بررسی شده در گروههای شاهد اول، شاهد دوم و گروه تابش نوترون هر کدام ۴۰۰ مورد، در گروه هیپرترمی تنها ۳۰۰ مورد و در بقیه گروهها هر کدام ۲۰۰ مورد می‌باشد. در تمام آزمایشات دوسری نمونه بعنوان شاهد اول و دوم در نظر گرفته شد که بر روی نمونه‌های شاهد اول هیچگونه بیماری انجام نشده است و شاهد دوم معرف نمونه‌هایی است که همزمان با کشت نمونه شاهد اول، آنها را درون انکوباتور 37°C گذاشته و پس از پایان مدت زمان تابش نوترون و هیپرترمی بر روی نمونه‌های دیگر همزمان با آنها از این نمونه شاهد، کشت تهیه شد تا اثر طول مدت زمان و همینطور تغییرات درجه حرارت در حین نقل و انتقال بر روی نمونه‌ها بررسی شود. برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و Student T-Test استفاده شد (۱).

نتایج:

در بررسی نتایج در هر دو گروه شاهد اول و دوم هیچگونه شکست کروموزومی مشاهده نشد و میانگین حذف و تبادل کروموزومی و کروماتیدی نیز در بین گروههای شاهد اول و دوم نزدیک به هم بود. در مجموع میانگین کل آسیب‌های بین دو گروه شاهد اول و دوم اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول شماره ۱). با اعمال هیپرترمی تنها در $41/5^{\circ}\text{C}$ مشاهده شد که میانگین شکافهای کروموزومی در گروههای مختلف

جدول شماره ۱: میانگین فراوانی انواع ناهنجاریهای کروموزومی و کروماتیدی در بررسی اثر

توأم هیپرترمی و تابش نوترون

میانگین کل آسیبها	میانگین حذف و زیادهای کروماتیدی	میانگین شکافهای کروماتیدی	میانگین حذف و زیادهای کروموزومی	میانگین شکافهای کروموزومی	تیمار
\pm SE	\pm SE	\pm SE	\pm SE	\pm SE	
$1/75 \pm 0/27$	$0/5 \pm 0/28$	$0/25 \pm 0/25$	$1 \pm 0/4$	۰	شاهد اول
$2 \pm 0/4$	$0/5 \pm 0/28$	۰	$1/5 \pm 0/28$	۰	شاهد دوم
$4/66 \pm 0/6$	۰	$0/66 \pm 0/33$	4 ± 1	۰	$41/5^{\circ}\text{C}$: ۶۰min
$*(11 \pm 1/5)$	$0/66 \pm 0/33$	$1/67 \pm 0/33$	8 ± 1	$*(0/67 \pm 0/33)$	43°C : 3۰min
$19 \pm 0/4$	$*(2/25 \pm 0/75)$	$*(2/5 \pm 0/95)$	$*(12/25 \pm 0/7)**$	$*(2 \pm 0/4)$	10 cGy
$26/5 \pm 3/5$	$5/5 \pm 3/5$	$0/5 \pm 0/5$	$(19 \pm 1)**$	$1/5 \pm 0/5$	10 cGy , $41/5^{\circ}\text{C}$: ۶۰min
$(29/5 \pm 3/5)***$	4 ± 1	4 ± 1	$(18 \pm 1)**$	$3/5 \pm 1/5$	10 cGy , 43°C : 3۰min

SE نشاندهنده خطای استاندارد می باشد.

* میانگین این نوع آسیب در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$).

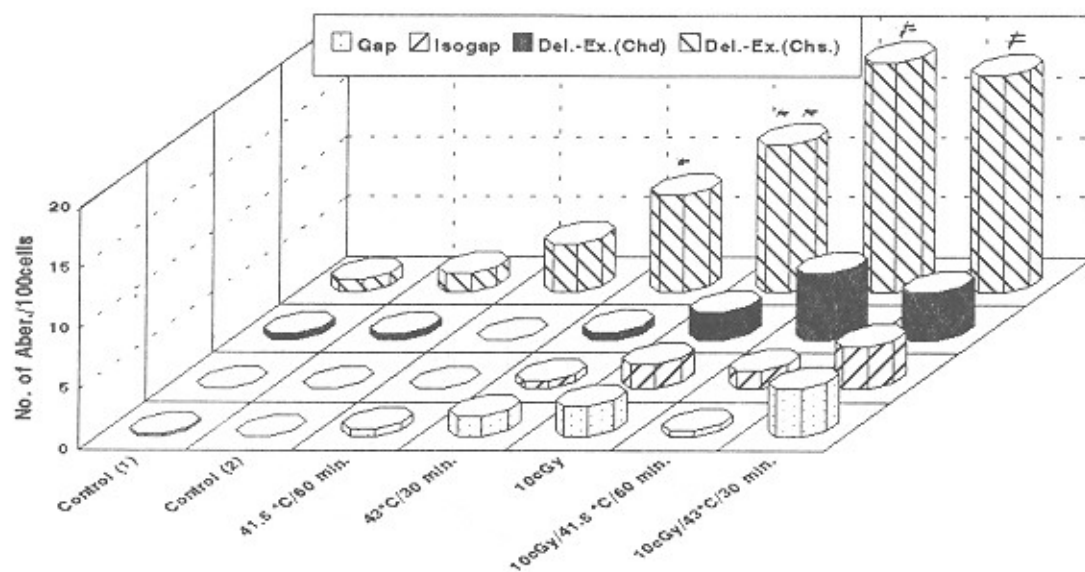
** میانگین این نوع آسیبها در این سه گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.01$).

*** میانگین کل آسیبها در این گروه با سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$).

شکافهای کروموزومی و کروماتیدی و آسیبهای از نوع حذف و تبادل کروموزومی و کروماتیدی در گروههای تابش دیده نسبت به گروههای شاهد اختلاف معنی دار دارند ($P < 0.05$). در مجموع فراوانی کل آسیبهای کروموزومی برای گروه شاهد اول در حداقل و برای گروه تابش دیده با 10 cGy نوترون در حداکثر می باشد. بررسی های آماری نیز اختلاف معنی داری را بین این دو گروه نشان می دهد ($P < 0.01$) (جدول شماره ۱).

در بررسی اثر توأم هیپرترمی و تابش اشعه مشاهده می شود میانگین شکافهای کروموزومی در گروههای تیمار شده با هیپرترمی و تابش، از سایر گروهها بیشتر است. بیشترین میزان این نوع آسیب در گروهی است که پس از دریافت 10 cGy نوترون، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 43°C واقع شدند. بررسی های آماری نیز بین این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱).

اختلاف معنی داری نشان نمی دهد، ولی در درجه حرارت 43°C و زمان ۳۰ دقیقه فراوانی این نوع آسیب از سایر گروهها بیشتر است. میانگین حذف و تبادل کروموزومی نیز در این گروه از سایر گروهها بیشتر است و با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد (نمودار شماره ۱). حداقل میانگین حذف و تبادل کروماتیدی در گروه $41/5^{\circ}\text{C}$ و ۶۰ دقیقه و حداکثر آن در گروه 43°C و ۳۰ دقیقه مشاهده شد. مقایسه آماری بین گروههای مختلف اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد (نمودار شماره ۱). در مجموع فراوانی کل آسیبهای کروموزومی برای شاهد اول در حداقل و برای گروه تیمار شده با هیپرترمی 43°C در مدت ۳۰ دقیقه در حداکثر می باشد. بررسی های آماری نیز بین این دو گروه اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱). بررسی نتایج در نمونههایی که فقط تحت تابش 10 cGy نوترون بودند نشان می دهد میزان



نمودار شماره ۱: فراوانی انواع ناهنجاریهای کروموزومی و کروماتیدی در بررسی اثر توأم هیپرترمی و تابش ۱۰۰Gy نوترون. * فراوانی میانگین حذف و تبدلات کروموزومی در این گروه با گروههای شاهد و گروه هیپرترمی ۶۰ min : ۴۱/۵۰°C اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$).

** فراوانی میانگین حذف و تبدلات کروموزومی در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.01$).

فراوانی میانگین حذف و تبدلات کروموزومی در این دو گروه با سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$).

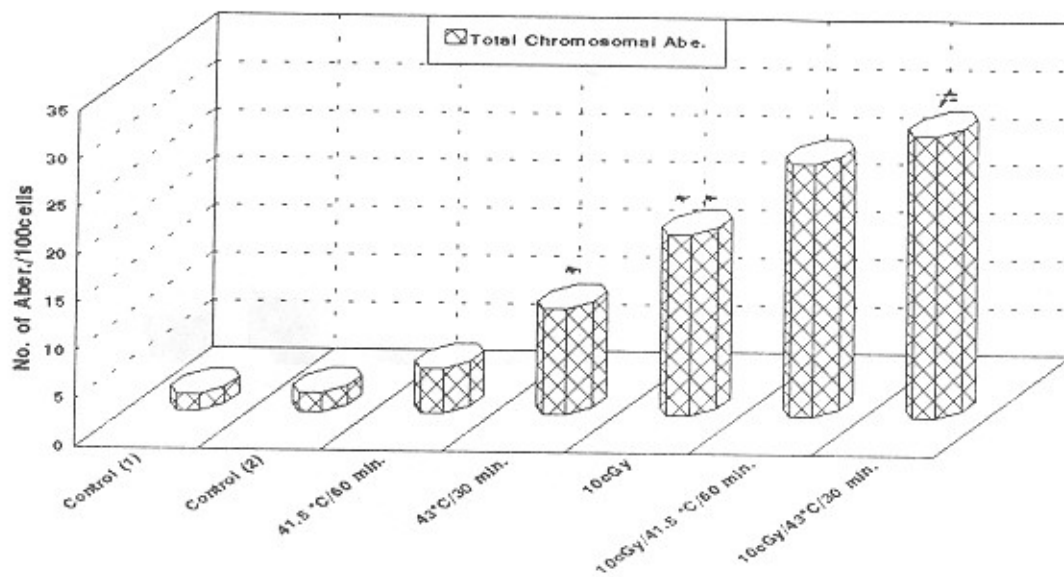
بحث:

همان طور که در جدول شماره ۱ و نمودارهای شماره ۱ و ۲ مشاهده می شود تابش دوزهای کم نوترون باعث ایجاد آسیبهای کروموزومی در لنفوسیت های خون محیطی انسان می شود. بررسی های آماری بر روی میزان فراوانی کل آسیب های بین گروههای تابش دیده و شاهد اختلاف معنی داری نشان می دهد ($P < 0.05$). بیشترین میزان آسیب ها با تابش نوترون از نوع تبادل کروموزومی بود.

این نتیجه با نتایج تحقیقات بسیار گسترده ای که در این زمینه انجام شده است همخوانی دارد. از جمله Maurizot و همکارانش در سال ۱۹۹۰ با تابش نوترونهای سریع بر روی DNA پلاسمید PBR322 نشان دادند که یک رابطه خطی بین ایجاد آسیب های dsb و دوز نوترون وجود دارد (۸).

فراوانی میانگین آسیب های از نوع حذف و تبادل کروموزومی نیز در این گروه از سایر گروهها بیشتر است و با گروههای شاهد و هیپرترمی تنها اختلاف معنی داری نشان می دهد ($P < 0.01$).

با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده می شود ماکزیم شکافهای کروماتیدی در گروهی است که ابتدا تحت تابش نوترون بوده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۴۳°C قرار گرفتند. بررسی های آماری نیز بین این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی داری نشان می دهد ($P < 0.01$) (جدول شماره ۱). در مجموع حداکثر میانگین کل آسیب ها در گروه ۴۳°C و ۳۰ دقیقه پس از تابش نوترون می باشد که نسبت به سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: فراوانی مجموع آسیب های کروموزومی در بررسی اثر توأم هیپرترمی و تابش ۱۰cGy نوترون.

* میانگین کل آسیبها در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$).

** میانگین کل آسیبها در این گروه با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.01$).

میانگین کل آسیبها در این گروه با سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$).

مطابقت دارد. این محققین با مطالعه اثرات حرارت در فازهای مختلف سیکل سلولی نتیجه گرفتند که حرارت به تنهایی در هیچ مرحله ای از سیکل سلولی باعث ایجاد آسیب های کروموزومی نمی شود (۱۸، ۱۷).

دماهای بالاتر از ۴۲°C باعث ایجاد آسیب DNA می شوند. در تحقیقی که Birnboim و Mitchel در سال ۱۹۸۵ با مطالعه بر روی لنفوسیت های خون محیطی انسان انجام دادند، نشان داده شد موقعی که درجه حرارت ۴۲ تا ۴۶°C اعمال شود در زنجیره DNA شکست ایجاد خواهد شد که باعث ناهنجاریهای کروموزومی می شود (۹). در تحقیق حاضر نیز در دمای ۴۳°C و زمان ۳۰ دقیقه تعداد آسیب های کروموزومی ایجاد شده با گروههای شاهد اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$)، که بیانگر اینست که اعمال این درجه حرارت بر روی لنفوسیت ها باعث ایجاد آسیب های کروموزومی خواهد شد. اما این نتیجه با نتایج تحقیقات Obe و Weissenborn متفاوت می باشد.

Szeinfeld و همکارانش در سال ۱۹۹۲ با مطالعه تومورهای CaNT موش که به طور مصنوعی هیپوکسیک شده و سپس تحت تابش نوترون قرار گرفته بودند تغییرات قابل ملاحظه ای در فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز پیدا کردند (۱۵). این نتایج نشان می دهد که نوترون هم در شرایط *In vitro* و هم در شرایط *In vivo* باعث ایجاد تغییرات قابل ملاحظه ای خواهد شد.

همانطور که در جدول شماره ۱ و نمودارهای شماره ۱ و ۲ نشان داده شد و با توجه به بررسی های آماری انجام شده، مشاهده می شود که میانگین کل آسیب های کروموزومی در اثر هیپرترمی تنها در درجه حرارت ۴۱/۵°C با نمونه های شاهد اختلاف معنی داری ندارند. لذا می توان نتیجه گرفت که هیپرترمی در درجه حرارت های کمتر از ۴۱/۵°C قادر به ایجاد آسیب های کروموزومی نمی باشد و این نتیجه با نتایج تحقیقات گسترده ای که Obe و Weissenborn در سالهای ۱۹۹۰ و ۱۹۹۱ انجام دادند

آنها نتیجه گرفتند هیپرترمی حتی در دمای 45°C به مدت ۱۵ دقیقه باعث ایجاد آسیب کروموزومی نخواهد شد (۱۸، ۱۷).

Raaphorst در سال ۱۹۹۰ مهمترین عامل تخریب سیستمهای بیولوژیکی در اثر حرارت را غیر فعال شدن پروتئینها و آنزیمها و همچنین جلوگیری از ساخته شدن RNA و DNA در نتیجه عدم فعالیت آنزیمهای مؤثر در سنتز عنوان کرد (۱۳). در بررسی اثر توأم هیپرترمی پس از تابش نوترون با توجه به جدول شماره ۱ و نمودارهای شماره ۱ و ۲ و بررسیهای آماری، مشاهده می شود در گروههایی که هیپرترمی پس از تابش اعمال شده است میزان فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی از سایر گروهها بیشتر است. این نتیجه با نتایج تحقیقات Dikomey در سال ۱۹۸۲ موافق است. او با مطالعه بر روی سلولهای CHO نشان داد اگر هیپرترمی در درجه حرارت های $42-45^{\circ}\text{C}$ پس از تابش اشعه اعمال شود باعث جلوگیری از ترمیم ssb شده و لذا تعداد آسیبها بیشتر خواهد شد (۵).

Horsman و Grau در سال ۱۹۹۱ با مطالعه بر روی سلولهای هیپوکسیک نشان دادند، موقعی که هیپرترمی پس از اشعه اعمال شود حساسیت پرتوی این سلولها زیاد خواهد شد (۱۲).

مطالعه Raaphorst و همکارانش در سال ۱۹۹۴ بر روی دو نوع تومور حساس و مقاوم به اشعه نشان داد که هیپرترمی پس از تابش با جلوگیری از ترمیم dsb باعث ایجاد آسیبهای بیشتری خواهد شد (۱۴).

در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد هیپرترمی پس از تابش، باعث افزایش تعداد آسیبهای کروموزومی می شود (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲).

Cai و Jiang در سال ۱۹۹۵ نیز با مطالعه بر روی لنفوسیت های خون محیطی انسان نشان دادند که هیپرترمی قبل از تابش اشعه X باعث ایجاد مقاومت نسبت به اشعه می شود (۳). البته در یک سری از

تحقیقات نتایجی متناقض با تحقیق حاضر بدست آمده است. از جمله Mittler در سال ۱۹۸۴ نشان داد اعمال هیپرترمی قبل از تابش نوترون باعث افزایش شکست های کروموزومی می شود و لذا باعث حساس تر شدن سلولها نسبت به اشعه نوترونی می شود (۱۰).

در تحقیق دیگری که توسط Nevaldine و همکارانش در سال ۱۹۹۴ انجام شد نشان داده شد که هیپرترمی 43°C به مدت ۴۵ دقیقه قبل یا بعد از تابش تأثیر یکسانی در جلوگیری از ترمیم dsb دارد (۱۱).

به طور کلی در ترکیب پرتوهای یونساز و هیپرترمی، میزان آسیب های کروموزومی افزایش می یابد و از آنجا که رابطه مستقیمی بین میزان این آسیبها و مرگ سلولی وجود دارد، می توان افزایش مرگ سلولی را در ارتباط با میزان آسیب های کروموزومی دانست. لذا به نظر می رسد هیپرترمی سبب شده است تا سیستم های ترمیم DNA نتوانند به طور مطلوب وظیفه خود را انجام دهند (۴). Obe و Weissenborn هم در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که ترمیم آسیب های ناشی از تابش، در فاصله زمانی بین تابش و هیپرترمی به صورت کامل انجام نمی شود که این ناشی از اثر هیپرترمی است (۱۷). Roti و Warters نیز در سال ۱۹۸۷ نشان دادند که

هیپرترمی پس از تابش اشعه باعث افزایش ناهنجاریهای کروموزومی می شود و نتیجه گرفتند که این عمل احتمالاً به علت جمع شدن پروتئین های غیر هیستونی در هسته سلولها می باشد و باعث غیر فعال شدن آنزیم های ترمیم کننده DNA و مهار عمل آنها می شود (۱۶). نتایج و مشاهدات نشان می دهد اعمال هیپرترمی (43°C) بعد از تابش دوزهای کم نوترون می تواند روش مناسبی برای از بین بردن سلولهای سرطانی باشد.

منابع:

- ۱- واین ودانیل. اصول و روشهای آمار زیستی؛ ترجمه آیت‌اللهی محمد تقی، انتشارات امیرکبیر، ۱۳۶۳.
- ۲- هال اریک ج. رادیوبیولوژی برای رادیولوژیست؛ ترجمه مزدارانی حسین، چاپ اول؛ انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، تابستان ۱۳۶۹.
- 3- Cai Lu.; Jiang Jie. Mild hyperthermia can induce adaptation to cytogenetic, damage caused by subsequent X-irradiation. *Radiat Res*, 143: 26-33, 1995.
- 4- Dewey WC.; Freeman ML. Cell biology of Hyperthermia and Radiation. *Int J Radiat Biol.* (Meyn R.E. Withers H. R. Eds.), 589-620, Raven press, New York, 1980.
- 5- Dikomey E. Effect of hyperthermia at 42 and 45°C on repair of radiation-induced DNA strand breaks in CHO cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 41(6): 603-14, 1982.
- 6- Evans HJ.; Maureen LO. Riordan: Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mut Res*, 31: 35-48, 1975.
- 7- Int. Atomic Energy Agency: Biological Dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose Assessment. Technical reports series, 260: Vienna 1986.
- 8- Maurizot SM.; Charlier M.; Sabatier R. DNA radiolysis by fast neutrons. *Int J Radiat Biol*, 57(2): 304-313, 1990.
- 9- Mitchel RE.; Birnboim HC. Triggering of DNA strand breaks by 45°C hyperthermia and its influence on the repair of gamma-radiation damage in human white blood cells. *Cancer Res*, 45(5): 2040-5, 1985.
- 10- Mittler S. Hyperthermia increases chromosome breakage and loss induced by fission neutrons in *Drosophila melanogaster*. *Mut Res*, 139(3): 119-21, 1984.
- 11- Nevaldine B.; Longo JA.; Hahn PJ. Hyperthermia inhibits the repair of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation as determined by pulsed-field-gel electrophoresis. *Int J Hyperthermia*, 10(3): 381-8, 1994.
- 12- Overgaard J.; Grau C.; Lindegaard JC.; Horsman MR. The potential of using hyperthermia to eliminate radioresistant hypoxic cells. *Radiother Oncol*, 20 (Suppl 1): 113-116, 1991.
- 13- Raaphorst GP. Fundamental aspects of hyperthermic biology. In: An introduction to the practical aspects of clinical hyperthermia. Tylor and Francis, 1990.
- 14- Raaphorst GP.; Mao JP.; Ng CE. Sublethal radiation damage repair and its inhibition by hyperthermia in two human melanoma cell lines of different radiosensitivities. *Melanoma Res*, 4(3): 157-61, 1994.
- 15- Szeinfeld D.; Villiers N.; Wynchank S. Modification of the effects of Hyperthermia and Neutron radiation on the activity of acid phosphatase in CaNT tumors. *Cancer Biochem Biophys*, 12(4): 253-61, 1992.
- 16- Warters RL.; Roti JL. The effect of hyperthermia on replicating chromatin. *Radiat Res*, 88: 69-78, 1981.
- 17- Weissenborn U.; Obe G. Modification of X-ray induced chromosome aberration frequency by pre-and postirradiation hyperthermia of human peripheral lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 59(4): 973-84, 1991.
- 18- Weissenborn U.; Obe G. Modification of bleomycin-induced chromosome aberrations by hyperthermia and under energy depleting conditions in human peripheral lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 62(3): 289-96, 1992.